

MODULARIO
1024-107

10/531853
PCT/EP 03/11239
Rec'd 07/PMed C.E. 8 APR 2005
EPO - DG 1 #2
21.11.2003

EPO3/11239

Ministero delle Attività Produttive⁵⁵

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

REC'D 01 DEC 2003

WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: Invenzione Industriale
N. PD2002 A 000271

Si dichiara che l'unica copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

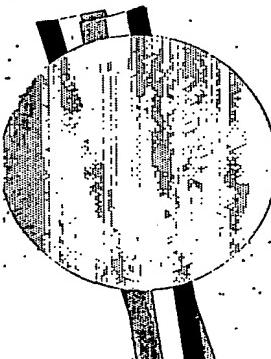
Inoltre Istanza di Accoglimento descrizione definitiva (pagg. 2).



1a, II

4 NOV. 2003

per IL DIRIGENTE
Paola Giuliano
Dr.ssa Paola Giuliano



PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO - CAPITALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

REG. A

NUMERO BREVETTO

DATA DI DEPOSITO

/ / / /

DATA DI RILASCIO

/ / / /

D. TITOLO

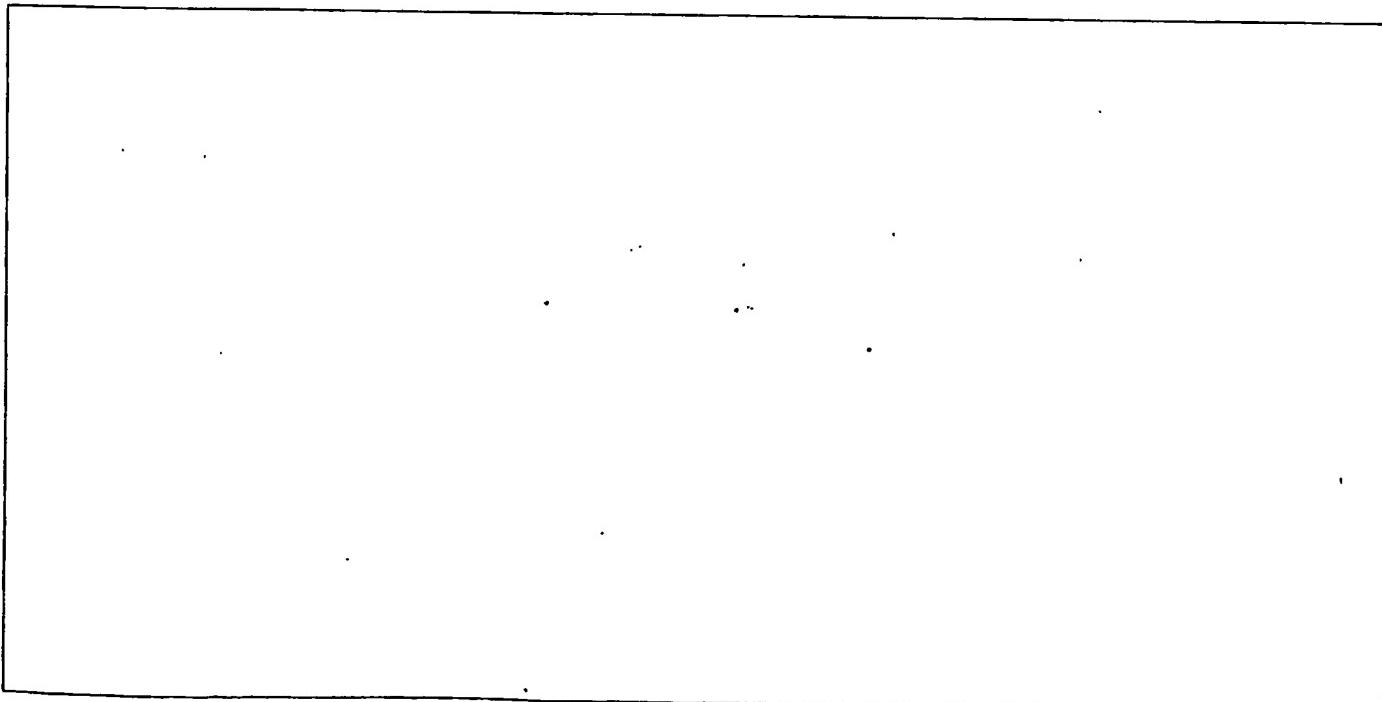
"Composti chimico-farmaceutici costituiti da derivati dei taxani legati covalentemente all'acido ialuronico o a suoi derivati".

L. RIASSUNTO

La presente invenzione descrive la preparazione e l'uso in campo oncologico di un nuovo "prodrug" appartenente alla famiglia dei taxani, quali il paclitaxel, ottenibile secondo un processo originale di sintesi diretta tra molecole di acido ialuronico e il paclitaxel, oppure indiretta mediante l'introduzione di uno "spazziatore" di collegamento tra l'acido ialuronico e il chemioterapico di cui sopra. Il nuovo prodrug rende il paclitaxel solubile, permettendo la sua immediata liberazione nei liquidi biologici. Pertanto, la sua somministrazione sistemica può avvenire senza i molteplici fenomeni di ipersensibilizzazione che normalmente si verificano durante l'uso del farmaco a causa della presenza del Cremophor EL, solvente di solubilizzazione attualmente utilizzato nei normali protocolli clinici di somministrazione del paclitaxel.



M. DISEGNO



Emilio Mauri

1

Descrizione di una invenzione industriale dal titolo "Composti chimico-farmaceutici costituiti da derivati dei taxani legati covalentemente all'acido ialuronico o a suoi derivati" della Fidia Farmaceutici S.p.A. con sede in Via Ponte della Fabbrica, 3/A - 35031 Abano Terme (PD), nella persona del suo Amministratore Delegato e Legale Rappresentante, Dr. Emilio Mauri.

*** ***

Inventori designati:

- 1) Marini Bettolo Rinaldo
- 2) Migneco Luisa Maria
- 3) De Luca Gilda

Depositata il con n° PD 2002 A 000271

*** ***

OGGETTO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione descrive la preparazione e l'uso in campo oncologico di un nuovo "prodrug" appartenente alla famiglia dei taxani, quali il paclitaxel, ottenibile secondo un processo originale di sintesi diretta tra molecole di acido ialuronico e il paclitaxel, oppure indiretta mediante l'introduzione di uno "spaziatore" di collegamento tra l'acido ialuronico e il chemioterapico di cui sopra.

Il nuovo prodrug rende il paclitaxel solubile, permettendo la sua immediata liberazione nei liquidi biologici. Pertanto, la sua somministrazione sistemica può avvenire senza i molteplici fenomeni di ipersensibilizzazione che normalmente si verificano durante l'uso del farmaco a causa della presenza del Cremophor





Autore: [Signature]
Titolo: [Signature]
Data: [Signature]

EL, solvente di solubilizzazione attualmente utilizzato nei normali protocolli clinici di somministrazione del paclitaxel.

CAMPO DELL'INVENZIONE

Il paclitaxel (Taxolo[®]) e il docetaxel (Taxotere[®]) sono agenti antitumorali (Huizing MT et al., Cancer Inv., 1995, 13: 381-404) che svolgono la loro azione antiproliferativa agendo sull'organizzazione dei microtubuli del sistema citoscheletrico cellulare: infatti, inibendo la depolarizzazione dei suddetti microtubuli, ne impediscono la normale riorganizzazione dinamica che avviene durante la divisione mitotica cellulare (Manfredi JJ et al., J Cell Biol, 1982, 94:688-696).

Le principali indicazioni terapeutiche del paclitaxel sono:

- terapia del tumore avanzato della mammella;
- terapia del sarcoma di Kaposi;
- terapia del carcinoma polmonare (non microcitoma);
- carcinoma ovario resistente al trattamento chemioterapico standard.

Inoltre, il suddetto chemioterapico viene normalmente utilizzato anche nel carcinoma della vescica, della prostata e dell'endometrio.

Il paclitaxel è un composto insolubile in acqua e, di conseguenza, la composizione farmaceutica che lo vede attualmente impiegato in terapia oncologica chemioterapica, comprende la sua miscelazione con Cremophor EL (olio di castoro) - alcool etilico, (Pfeifer RW et al., Am J Hosp Pharm, 1993, 50:2520-2521) in rapporto 1:1, ed è in questa formulazione che viene normalmente somministrato per



[Signature]
Farmacista Responsabile
Firma farmacopei

infusione endovenosa continua (da 3 a 24 ore) al dosaggio di 135 - 175 mg/m².

Tuttavia, la presenza del Cremophor EL nella formulazione sopra descritta rappresenta la principale causa delle reazioni avverse che normalmente avvengono durante la somministrazione del paclitaxel, rappresentate sia da fenomeni di banale orticaria che da dispnea e broncospasmo, fino allo shock anafilattico conclamato (Weiss RB et al., J Clin Oncol, 1990, 8:1263-1268).

Per questo motivo, tutti i pazienti in trattamento con la composizione farmaceutica paclitaxel-Cremophor EL devono essere sottoposti, prima dell'inizio della terapia, ad un protocollo di premedicazione, che consiste nella somministrazione di desametasone, eventualmente associato ad un antistaminico.

Nonostante questo tipo di trattamento farmacologico, fino al 40% dei pazienti sottoposti all'infusione endovenosa di paclitaxel vanno incontro ad avverse reazioni di diversa gravità.

Possiamo dunque affermare che la formulazione del Taxolo® attualmente in uso clinico, e le sue modalità di somministrazione, costituiscono un limite all'efficacia terapeutica dello stesso. E' questo il motivo per cui la ricerca si è attualmente orientata verso la sintesi di un "prodrug" di paclitaxel solubile in acqua, e/o verso nuove formulazioni del suddetto farmaco antitumorale.

Il paclitaxel è un alcaloide attualmente ottenuto per via semisintetica da un suo precursore derivato dagli aghi di *Taxus Baccata*.



Eugenio
 Aminimenti - Dott. Eugenio
 S.p.A.
 Farmaceutici



Chimicamente è costituito da un anello taxanico a 15 atomi di carbonio legato ad un anello ossietanico in posizione C4 e C5, in posizione C13 è invece presente un legame estereo, considerato indispensabile per la sua attività antitumorale.

Per superare i problemi conseguenti al tipo di formulazione farmaceutica del paclitaxel, in questi ultimi anni sono stati effettuati numerosi tentativi sperimentali sia per renderlo solubile in acqua sia per definirne nuove modalità di somministrazione. Si è cercato, ad esempio, di incapsulare il suddetto antitumorale in liposomi, nanocapsule e microsfere costituite da una parete polimerica formata da co-polimeri biodegradabili (come l'acido polilattico) e non biodegradabili (come l'etilene-vinil-acetato).

Inoltre, sono state preparate microsfere caricate con paclitaxel formate da un polimero biodegradabile, come il poli-fosfoestere, per creare, nella terapia del carcinoma polmonare, un sistema di rilascio prolungato del farmaco nel sito di trattamento (Nuijen B et al., *Investigational New Drugs*, 2001, 19:143-153).

Si è anche cercato di preparare delle micelle del suddetto antitumorale co-precipitando, in solvente organico, il paclitaxel con fosfatidicolina/sali biliari (Nuijen B et al., *Investigational New Drugs*, 2001, 19:143-153).

Tuttavia, questi nuovi sistemi d'incapsulazione del paclitaxel possono presentare problemi di stabilità, produzione e riproducibilità.

Sono stati effettuati anche diversi tentativi di solubilizzazione del



Elio Maturi
Amministratore Delegato
Fidia Farmaceutici S.p.A.

sudetto farmaco con ciclodestrine, ma le nuove formulazioni non hanno dato i risultati desiderati (Nuijen B et al., Investigational New Drugs, 2001, 19:143-153).

La ricerca chimica di nuove formulazioni di paclitaxel, che rendano il farmaco maggiormente idrosolubile mantenendone inalterata l'efficacia come agente antitumorale, ha portato alla sintesi di nuovi analoghi modificati in C2^l e C7 (domanda di brevetto US2001/0018531) ed, inoltre, alla preparazione di nuovi prodrug.

I prodrug sono derivati terapeuticamente inattivi del farmaco, il quale diventa attivo solamente all'interno del corpo in cui viene introdotto, grazie a spontanei processi di idrolisi e/o degradazioni enzimatiche del prodrug, portando così alla liberazione del principio attivo.

In quest'ottica, e per i precedenti descritti motivi, sono stati effettuati molti tentativi di sintesi di nuovi prodrug portando, ad esempio, alla preparazione di farmaci come l'acetil-paclitaxel (Mellado W et al., Biochem Biophys Res Commun, 1984, 124(2): 329-336), o alla sintesi di nuovi esteri del sudetto farmaco con il succinato, il glutarato e l'acido sulfonico sul carbonio in posizione C2^l, esteri che, tuttavia, sono risultati instabili in ambiente acquoso.

Sono stati, inoltre, sintetizzati alcuni derivati aventi il gruppo estero in C2^l o C7 rappresentato dal fosfonossifenilpropionato, come il paclitaxel-2^l-carbonato, e una serie di nuovi esteri aminoacidici del paclitaxel (e di derivati di quest'ultimi) aventi un



gruppo glutarilico in posizione C2^I.

La glutaril-paclitaxel-asparagina e la glutaril-paclitaxel-glutamina sono risultati essere i due prodotti maggiormente idrosolubili ottenuti dalla sintesi sopra descritta e, tuttavia, meno efficaci rispetto al paclitaxel come tale (Nuijen B et al., Investigational New Drugs, 2001, 19:143-153).

E' inoltre noto anche l'utilizzo del PEG (poli-etilen-glicole) per la derivatizzazione del suddetto chemioterapico mediante esterificazione del paclitaxel in posizione C2^I; tuttavia la nuova molecola è risultata molto idrosolubile ma con una limitata stabilità.

Infine, è stato sviluppato recentemente un nuovo sistema di "delivery system" del suddetto farmaco ottenuto tramite coniugazione del paclitaxel con la proteina sierica albumina (HSA); il coniugato paclitaxel-HSA è risultato essere molto idrosolubile, capace di trasportare fino a 30 molecole di chemioterapico, tuttavia sperimentazioni effettuate in vitro hanno evidenziato una minore efficacia antitumorale rispetto al paclitaxel *di per se* (Nuijen B et al., Investigational New Drugs, 2001, 19:143-153).

La presente invenzione descrive, quindi, un processo di sintesi di un nuovo prodrug formato dal paclitaxel covalentemente legato all'Acido Ialuronico (di seguito denominato HA) ed il suo uso nella preparazione di composizioni farmaceutiche da impiegarsi in campo oncologico.

Recentemente è stato sintetizzato un nuovo sistema di rilascio del



Amministratore
Amministratore
Fiduciaria

paclitaxel esterificato con HA precedentemente modificato, ovvero derivatizzato con molecole di idrazide legate al gruppo carbossilico dell'HA tramite legame ammidico (Luo Y et al., Biomacromolecules. 2000, 1(2):208-218) (Brevetto US n. 5,874,417).

Si è così ottenuto un nuovo sistema di trasporto del paclitaxel che permette al farmaco di raggiungere direttamente la superficie della membrana della cellula tumorale bersaglio, la quale è caratterizzata da una sovra-espressione del recettore per l'HA, il CD44. Di conseguenza, il paclitaxel legato all'HA risulta capace di legarsi specificatamente al CD44 della cellula tumorale, potendo così entrare (grazie ad un processo di endocitosi) nel citoplasma cellulare dove il paclitaxel può venire enzimaticamente liberato e reso attivo dalla sua azione di inibizione della depolarizzazione della tubulina e, dunque, della divisione cellulare.

Questo meccanismo di trasporto selettivo del farmaco viene definito di "targeting" alla cellula bersaglio.

È, inoltre, noto l'uso di HA come veicolo di farmaci antitumorali, formulato in composizioni farmaceutiche in associazione (e non covalentemente legato) a chemioterapici come il paclitaxel, per aumentarne l'efficacia terapeutica grazie al fenomeno di targeting precedentemente descritto (domanda di brevetto internazionale PCT n. WO0041730) e poterne, inoltre, abbassare le dosi comunemente usate nei normali protocolli di terapia oncologica (domanda di brevetto internazionale PCT n. WO9902151).

Infine, è noto l'uso di HA (a basso peso molecolare) e/o di suoi



...ma non è più possibile
Invenzione PCT
di farmaci



derivati lipidici, per la formulazione di liposomi utilizzati per il rilascio di farmaci anche antitumorali, come il paclitaxel (domanda di brevetto internazionale PCT n. WO0139815).

La presente invenzione descrive un originale processo di sintesi di un nuovo prodrug costituito da paclitaxel covalentemente legato all'HA ed il suo potenziale uso nella terapia oncologica.

Il nuovo legame covalente del polisaccaride al paclitaxel consente di:

- 1) rendere il prodotto immediatamente solubile nel circolo sanguineo;
- 2) preparare una formulazione svincolata dalla miscelazione con Cremophor EL, consentendo di superare tutti i problemi di ipersensibilizzazione e anafilassi precedentemente descritti;
- 3) ottenere un farmaco che, grazie all'azione enzimatica della esterasi comunemente presente nel plasma, viene immediatamente liberato dal suo veicolo nel letto sanguineo, potendo così svolgere liberamente la sua azione antitumorale.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente invenzione descrive la preparazione di un nuovo prodrug costituito da un componente della famiglia dei taxani, quale il paclitaxel, ottenuto tramite una nuova sintesi chimica tra il farmaco e l'HA, utilizzando, preferibilmente, uno spaziatore che si interfaccia sia col paclitaxel sia con acido ialuronico, essendo legato covalentemente ad entrambe le molecole, ed il suo impiego in campo oncologico.





Ministero della Salute
Istituto Superiore di Sanità
Roma - Italia

L'HA è un etero-polisaccaride composto da residui alternati di acido D-glucuronico e N-acetil-D-glucosammina. E' un polimero a catena lineare con peso molecolare che può variare tra 50.000 e 13×10^6 Da, a seconda della fonte dalla quale viene ottenuto e dai metodi di preparazione impiegati. E' presente in natura nei gel pericellulari, nella sostanza fondamentale del tessuto connettivo degli organismi vertebrati (dei quali rappresenta uno dei componenti principali), nel fluido sinoviale delle articolazioni, nell'umor vitreo e nel cordone ombelicale.

L'HA gioca un ruolo importante nell'organismo biologico, come supporto meccanico delle cellule di molti tessuti come la pelle, i tendini, i muscoli e la cartilagine.

E' il principale componente della matrice extracellulare, ma svolge altresì altre funzioni come l'idratazione dei tessuti, la lubrificazione, la migrazione e il differenziamento cellulare.

L'HA utilizzato nella presente invenzione può derivare da qualsiasi fonte, ad esempio, per estrazione da creste di gallo (brevetto europeo n. 0138572 B1), per via fermentativa (domanda di brevetto europea n. 0716688), o per via tecnologica (domanda di brevetto italiana n. PD94A000042) ed avere un peso molecolare compreso tra i 400 e 3×10^6 Da, in particolare tra 400 e 1×10^6 Da, ancor più in particolare tra 400 e 200.000 Da.

I derivati dell'HA che possono essere utilizzati nel processo di sintesi del prodrug HA-paclitaxel, oggetto della presente invenzione, sono di seguito elencati:



A. Bolognesi - G. C. De Giacomo
P. L. D'Amato - G. P. M.

- 1) HA salificato con basi organiche e/o inorganiche;
- 2) Hyaff®: esteri dell'HA con alcoli della serie alifatica, aralifatica, cicloalifatica, aromatica, ciclica ed eterociclica, con una percentuale di esterificazione che può variare a seconda del tipo e della lunghezza dell'alcool usato, comunque mai superiore al 50% di esterificazione, preferibilmente tra lo 0,1 e il 20% poiché il polimero finale che si ottiene deve essere sempre idrosolubile, mentre la restante percentuale di HA non esterificata deve essere salificata con basi organiche e/o inorganiche (brevetto europeo n. 0216453 B1);
- 3) Hyadd™: ammidi dell'HA con ammine della serie alifatica, aralifatica, cicloalifatica, aromatica, ciclica ed eterociclica, con una percentuale di amidazione dal 0,1 al 10%, poiché il polimero finale deve essere sempre idrosolubile, mentre la restante percentuale di HA non sottoposta ad amidazione deve essere salificata con basi organiche e/o inorganiche (domanda di brevetto europea pubbl. n. 1095064);
- 4) Derivati O-solfatati dell'HA fino al 4° grado di solfatazione (brevetto europeo n. 0702699 B1);
- 5) ACP®: esteri interni dell'HA con una percentuale di esterificazione non superiore al 10%, poiché il polimero deve essere sempre idrosolubile, preferibilmente tra lo 0.05 e il 5% di esterificazione, mentre la restante percentuale di HA non esterificata deve essere salificata con basi organiche e/o inorganiche (brevetto europeo n. 0341745 B1);



Emanuele Marzocchi
 Amministratore Delegato
 BiOfarmaceutici S.p.A.

- 6) Deacetilati dell'HA: derivano dalla deacetilazione della frazione N-acetil-glucosamina con una percentuale di deacetilazione preferibilmente tra lo 0,1 e il 30%, mentre tutti i gruppi carbossilici dell'HA devono essere salificati con basi organiche e/o inorganiche (domanda di brevetto internazionale PCT n. WO 02/18450);
- 7) Hyoxx™: derivati percarbossilati dell'HA ottenuti dall'ossidazione dell'ossidrile primario della frazione N-acetil-glucosamina con grado di percarbossilazione tra lo 0 e il 100% e, preferibilmente, tra il 25 e il 75%. Tutti i gruppi carbossilici dell'HA devono essere salificati con basi organiche e/o inorganiche (domanda di brevetto internazionale PCT n. WO 02/18448).

È, inoltre, possibile ottenere il prodrug HA-paclitaxel partendo inizialmente da molecole di HA non chimicamente modificato e, solo successivamente alla sintesi con il chemioterapico, modificare l'HA esterificandolo con tutti gli alcoli sopra elencati per gli Hyaff®, oppure formare esteri interni come avviene per l'ACP® (vedi Esempio 8).

I derivati dell'HA precedentemente elencati, che risultano particolarmente importanti nel processo di sintesi del prodrug HA-paclitaxel, sono i derivati deacetilati e solfatati in quanto, a parità di percentuale di sostituzione del paclitaxel all'acido ialuronico non precedentemente modificato, rendono il prodotto finale maggiormente solubile nel circolo sanguineo.

È noto che l'HA, attraverso il recettore di membrana CD44, modula



Eugenio Massi
AMMINISTRATORE DELEGATO
Ridia farmaceutici S.p.A.

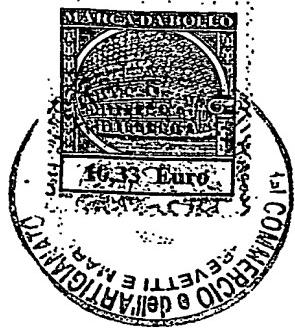
molti e diversi processi relativi alla fisiologia e alla biologia della cellula come, ad esempio, la proliferazione, il differenziamento e la locomozione della cellula tumorale e non.

Recentemente la letteratura scientifica ha dimostrato l'efficacia antitumorale dell'acido ialuronico quando iniettato come tale direttamente nella massa tumorale dove, infatti, è risultato essere in grado di determinare la completa regressione del 30% dei tumori trattati con HA (Herrera-Gayol A et al., *Experimental and Molecular Pathology*, 2002, 72:179-185).

E', inoltre, nota la possibilità di associare l'HA ad un qualsiasi chemioterapico per la preparazione di molte e differenti composizioni farmaceutiche, in quanto questo polisaccaride sarebbe in grado di agire come un secondo antineoplastico che potenzia sinergicamente l'azione antitumorale del farmaco ad esso associato (domanda di brevetto internazionale PCT n. WO0147561); in alternativa, l'HA viene rivendicato anche come solo farmaco antitumorale da somministrare in diversi protocolli clinici per la riduzione/regressione della massa tumorale (domanda di brevetto internazionale PCT n. WO9740841).

Il nuovo prodrug oggetto della presente invenzione, come precedentemente prescritto, si distanzia da tutte le formulazioni del paclitaxel sopra descritte in quanto caratterizzato dall'immediata liberazione dell'antineoplastico che si stacca dall'HA (o da un suo derivato) nel circolo sanguineo.

Il nuovo farmaco può essere somministrato per via endovenosa,



Emanuele Marzulli
Amministratore delegato
Fidia Farmaceutici S.p.A.

intramuscolare, transdermica, sottocutanea, orale o direttamente nel sito tumorale per iniezione diretta.

L'HA, o il suo derivato, che si libera del suddetto prodrug, può agire in duplice modo:

- 1) come veicolo al paclitaxel;
- 2) come farmaco antitumorale di per sé.

La Richiedente, nell'esempio che segue, dimostrerà come il trattamento della massa tumorale creata sperimentalmente in topi nudi con il derivato autoreticolato dell'HA, ACP®, determini una significativa regressione del tumore rispetto ai controlli non trattati.

La Richiedente, quindi, descrive per la prima volta per l'HA (e per i suoi derivati) che si libera dal prodrug HA-paclitaxel, il nuovo ruolo di farmaco antineoplastico, ed i relativi suoi usi in campo oncologico..

Il prodrug oggetto della presente invenzione può, inoltre, essere associato a diverse molecole biologicamente e farmacologicamente attive quali, ad esempio, steroidi, ormoni, proteine, fattori trofici, vitamine, farmaci antinfiammatori non steroidei, chemioterapici, calcio-antagonisti, antibiotici, antivirali, interleuchine e citochine come, ad esempio, l'interferone.

In questo modo si possono ottenere molteplici associazioni dei farmaci sopra-elencati e relative diverse composizioni farmaceutiche contenenti il prodrug oggetto della presente invenzione.

La sintesi chimica tra l'HA o i suoi derivati e il paclitaxel (o altri



[Handwritten signature]
 Commissario Difesa
 Guido Lanza - 10/10/2001

membri della famiglia dei taxani) può avvenire secondo i seguenti processi:

- 1) attraverso un processo di sintesi indiretta, che comprende l'introduzione di uno spaziatore tra il farmaco antitumorale e l'HA oppure;
- 2) mediante sintesi diretta tra il paclitaxel e l'HA.

I gruppi funzionali dell'HA o dei suoi derivati, che possono reagire direttamente con l'antineoplastico oppure, indirettamente, tramite lo spaziatore, sono i seguenti:

- 1) gruppi ossidrilici;
- 2) gruppi carbossilici;
- 3) gruppi amminici dell'HA deacetilato.

Lo spaziatore è costituito da una catena alifatica o aralifatica, lineare o ramificata, che può presentare gruppi ossidrilici, carbossilici, carbonilici, gruppi amminici con l'esclusione delle idrazidi, epossidici, cloruri acilici, tioli, nitrili, alogenini, anidridi, isocianati e isotiocianati.

In particolare, sono preferibili i bromuri di acidi carbossilici da C3 a C10, come l'acido bromopropionico o l'acido bromobutirrico.

La reazione di sintesi tra i gruppi funzionali ossidrilici dell'HA (o dei suoi derivati) ed un componente taxanico quale il paclitaxel, può avvenire tramite un processo di sintesi indiretta o diretta.

La sintesi indiretta può portare alla formazione, tra lo spaziatore e l'HA, dei seguenti tipi di legame covalente:

legame estereo:



M. Mazzoni
Amministratore Delegato
Fidia Farmaceutici

- A) coinvolge la funzione carbossilica dello spaziatore (opportunamente scelto) che viene attivata da un agente attivante come, ad esempio, la carbodiimmide;
- B) coinvolge i gruppi ossidrilici dell'HA (o dei suoi derivati) che vengono bromurati o sostituiti con un gruppo tosilato, con successiva sostituzione nucleofila da parte del carbossile dello spaziatore (opportunamente scelto);
- C) coinvolge la funzione anidridica dello spaziatore (opportunamente scelto);

legame uretanico:

- A) coinvolge il gruppo amminico dello spaziatore (opportunamente scelto);
- B) coinvolge la funzione isocianato oppure isotiocianato dello spaziatore (opportunamente scelto);

legame etereo:

- A) coinvolge la funzione epossidica dello spaziatore (opportunamente scelto);
- B) coinvolge i gruppi ossidrilici dell'HA (o dei suoi derivati) che vengono bromurati o sostituiti con un gruppo tosilato, con successiva sostituzione nucleofila da parte dell' ossidrile dello spaziatore (opportunamente scelto);

legame acetalico:

- A) coinvolge il gruppo aldeilico e/o chetonico dello spaziatore (opportunamente scelto);
- B) coinvolge il gruppo ossidrilico dello spaziatore





(opportunamente scelto) e richiede la presenza di un composto carbonilico semplice come la formaldeide.

Le sintesi sopra descritte possono essere effettuate mediante l'utilizzo di agenti attivanti al gruppo ossidrilico dell'HA o dei suoi derivati quali, ad esempio, la carbodiimmide.

La reazione di sintesi diretta tra i gruppi funzionali ossidrilici dell'HA (o dei suoi derivati) ed un componente taxanico quale il paclitaxel, può portare alla formazione del seguente tipo di legame covalente:

legame acetalico: coinvolge il gruppo ossidrilico del componente taxanico e le funzioni ossidriliche dell'HA (o dei suoi derivati), che vengono covalentemente legate mediante l'aggiunta di un composto carbonilico semplice come, ad esempio, la formaldeide.

La reazione di sintesi tra i gruppi funzionali carbossilici dell'HA ed un componente taxanico quale il paclitaxel, può avvenire tramite un processo di sintesi indiretta o diretta.

La sintesi indiretta può portare alla formazione, tra lo spaziatore e l'HA, dei seguenti tipi di legame covalente:

legame estereo:

- A) il gruppo carbossilico dello spaziatore opportunamente scelto come, ad esempio, l'acido bromobutirrico viene attivato da un agente attivante come, ad esempio, la carbodiimmide e così reso idoneo alla sintesi con la



[Handwritten signature]
Fidia farmaceutici

funzione ossidrilica (preferibilmente del carbonio in C2!) del componente taxanico, come il paclitaxel. Successivamente, per contatto diretto in ambiente anidro con il sale di TBA (tetrabutilammonio) dell'HA o di un suo derivato, si ottiene una sostituzione nucleofila del carbossile al bromo. In questo modo si determina un legame estereo tra l'HA e lo spaziatore legato, a sua volta, al paclitaxel;

- B) mediante l'utilizzo di attivanti del gruppo carbossilico dell'HA (o di un suo derivato), come ad esempio, la carbodiimmide, si può ottenere un legame estereo tra il suddetto gruppo e la funzione ossidrilica dello spaziatore (opportunamente scelto) precedentemente o successivamente legato al paclitaxel;

legame ammidico:

l'attivazione della funzione carbossilica dell'HA (o dei suoi derivati) tramite un agente attivante, rende possibile il legame con il gruppo amminico dello spaziatore opportunamente scelto (con l'esclusione di tutte le idrazidi) precedentemente o successivamente legato al paclitaxel.

La sintesi diretta può portare alla formazione dei seguenti tipi di legame covalente:

legame estereo:

- A) l'attivazione della funzione carbossilica dell'HA (o di un suo derivato) mediante un agente attivante, rende possibile il suo legame con il gruppo ossidrilico del componente





 Sign. Maggi
 Sott. del Consiglio Della
 Provincia di Genova

taxanico;

- B) l'attivazione dell'ossidrile del componente taxanico mediante agente attivante rende possibile il suo legame con la funzione carbossilica dell'HA o di un suo derivato;
- C) il seguente tipo di legame richiede la preparazione del bromuro o del tosilato del componente taxanico, il suddetto legame avviene per sostituzione nucleofila del bromuro o del gruppo tosilato da parte del gruppo carbossilico dell'HA o di un suo derivato.

La reazione di sintesi tra i gruppi amminici dell'HA deacetilato e un componente taxanico come il paclitaxel, può avvenire tramite un processo di sintesi indiretta e diretta.

La sintesi indiretta può portare alla formazione, tra lo spaziatore e l'HA, dei seguenti tipi di legame covalente:

legame ammidico: coinvolge il gruppo carbossilico dello spaziatore opportunamente scelto;

legame uretanico: coinvolge il gruppo ossidrilico dello spaziatore opportunamente scelto.

La sintesi diretta può portare alla formazione del seguente tipo di legame covalente:

legame uretanico: coinvolge il gruppo ossidrilico del componente taxanico e la funzione amminica dell'HA deacetilato.

Allo stesso modo, il legame che coinvolge lo spaziatore e un componente taxanico quale il paclitaxel, può essere di tipo estereo, uretanico o acetalico e richiedere la presenza di un agente attivante



E. Mazzoni
 Amministratore Delegato
 S.I.P. Farmaceutici S.p.A.

soprattutto per il legame estereo e uretanico.

Lo spaziatore può essere legato al componente taxanico (come ad esempio il paclitaxel) precedentemente o successivamente al suo legame con i gruppi funzionali dell'HA o dei suoi derivati, in relazione al tipo di gruppi funzionali dello spaziatore opportunamente scelto.

Le percentuali di legame diretto o indiretto del componente taxanico (quale, ad esempio il paclitaxel), all'HA o ad un suo derivato, possono variare tra lo 0,1 e il 50% e preferibilmente tra lo 0,1 e il 20%.

A scopo puramente descrittivo e non limitativo vengono riportati alcuni esempi di preparazione del prodrug HA-paclitaxel secondo la seguente invenzione:

Esempio 1

Effetto dell'ACP® gel in topo nudo dopo impianto di cellule neoplastiche. Determinazione della curva di sopravvivenza.

Per la sperimentazione sono state utilizzate cellule di carcinoma colico umano HT29. Sono stati utilizzati topi nudi immunodepressi che appartengono alla specie Athymic Nude-nu (nu/nu).

In ogni animale anestetizzato sono stati iniettati in cavità peritoneale 0,3 ml di una sospensione cellulare HT29 alla concentrazione di 166.000 cellule/ml, pertanto ogni topo riceveva 50.000 cellule tumorali.

Schema sperimentale:

Animali trattati: 113 animali sono stati inizialmente inoculati con



HT29 e, subito dopo il suddetto intervento, hanno ricevuto una singola dose di trattamento pari a 0,2ml di ACP gel 40mg/ml;

Animali di controllo: 117 animali sono stati inizialmente inoculati con la sospensione tumorale HT29 e successivamente non sottoposti a trattamento.



Curva di sopravvivenza: la curva di sopravvivenza è stata calcolata dalla data dell'intervento alla data del decesso, quest'ultimo inteso o come morte riscontrata o come soppressione dell'animale in caso di perdita di peso superiore al 20% rispetto al peso di partenza, ed in caso di emoperitoneo indice di metastasi diffusa.

La percentuale di sopravvivenza dei due gruppi veniva determinata quotidianamente e graficata per ottenere la curva sotto riportata (Figura 1).

La sperimentazione è durata 120 gg, alla scadenza dei quali tutti gli animali sopravvissuti sono stati sacrificati e sottoposti ad esame necroscopico per il controllo della presenza di tumore addominale.

Risultati: 32 animali su 230 non avevano sviluppato nessuna neoplasia rilevabile; 22 di questi animali appartenevano al gruppo di topi trattati con ACP® gel, 10 al gruppo di controllo.

ACP® gel: il 19.5% degli animali così trattati non hanno sviluppato neoplasie;

Controllo: l'8.5% degli animali di controllo non ha sviluppato neoplasie.



Firma del ministro

Esempio 2

Preparazione di HA con un peso molecolare compreso tra 5.000 e 10.000 Da (per una eventuale sintesi di prodrug del paclitaxel con HA a basso peso molecolare)

2,40 g di HA sodico con un peso molecolare di 990.000 Da sono solubilizzati in 240 ml di soluzione di NaCl 0.15M. Vengono quindi aggiunti 7.9 ml di una soluzione di NaOCl al 14%. Mantenendo la temperatura a +4°C, la soluzione è sottoposta a sonicazione per 120' con una frequenza di 20Hz e una potenza di 150W. Una volta completata la reazione, il pH è portato a 6.5 con HCl 0.1N e, successivamente, precipitato in 1000 ml di una miscela metanolo-acetone 2:1. Il prodotto è recuperato mediante filtrazione e seccato sotto vuoto per 48 ore a 45°C. Si ottengono, così, 1,65g di prodotto sodico. L'analisi HPLC (cromatografia liquida ad alta pressione)-GPC rivela che la frazione di HA ottenuta ha un peso molecolare medio (MW) di 5.850, un peso molecolare medio numerico (MN) di 3.640, e un indice di polidispersione di 1,61.

Esempio 3

Preparazione di un derivato estereo dell'HA legato al paclitaxel con un grado di esterificazione al carbossile di circa 4%

51 mg di paclitaxel sono sciolti in CH₂Cl₂ e alla soluzione vengono aggiunti 104 mg di 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimmide (EDC) e 20 mg di acido-4-bromobutirrico; successivamente la soluzione viene partizionata in acqua. Dopo l'eliminazione dei residui di carbodiimmide e di bromuro, il solvente di reazione è



~~S. S. P. I.~~
Amministratore
Siddi Formicelli S.p.A.

essiccato con sodio solfato anidro ed eliminato tramite rotavapor. 21 mg di prodotto così ottenuto vengono sciolti in n-metilpirrolidone (NMP) ed aggiunti ad una soluzione 20 mg/ml di HA salificato con tetrabutilammonio (TBA) in NMP (200mg in 10ml NMP). Dopo 7 giorni di reazione a temperatura ambiente, la soluzione viene diluita con 5 ml di acqua e con 1 ml di soluzione di NaCl satura. La soluzione così ottenuta è lasciata in agitazione per 1 ora per permettere lo scambio del sodio con lo ione TBA. Successivamente, viene aggiunto etanolo goccia a goccia ed il prodotto filamentoso così ottenuto è sciolto in acqua, dializzato e, infine, liofilizzato.

Esempio 4

Preparazione di un derivato estereo dell'HA con il paclitaxel con un grado di esterificazione al carbossile di circa il 10%

Analogamente a quanto fatto per l'Esempio 3, a 308,7 mg di paclitaxel sciolto in 15 ml di diclorometano, vengono aggiunti 117,2 mg di acido 4-bromobutirrico e 614.1 mg di EDC. Successivamente, alla soluzione è aggiunta acqua per l'eliminazione totale del bromuro e della carboimmide. Alla soluzione organica così ottenuta, viene aggiunto del sodio solfato per anidrificare mentre il solvente è eliminato tramite rotavapor. Al termine si ottengono 363 mg di prodotto intermedio.

175 mg di intermedio così ottenuto, vengono aggiunti a 1g di HA-TBA sciolto in NMP anidro, la soluzione è mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per 7 giorni, al termine dei quali vengono



*Emin...
Amministratore
Fidia farmaceutici S.p.A.*

aggiunti 20 ml di acqua bidistillata e 4 ml di soluzione satura di NaCl. Il tutto viene lasciato in agitazione per 1 ora per permettere lo scambio del sodio con lo ione TBA. Successivamente, viene aggiunto etanolo goccia a goccia ed il prodotto filamentoso così ottenuto è sciolto in acqua, dializzato e, infine, liofilizzato.

Esempio 5

Preparazione di un derivato estero dell'HA con il paclitaxel con un grado di esterificazione al carbossile di circa il 16%

164 mg di prodotto intermedio, ottenuti secondo la procedura descritta negli esempi precedenti 3 e 4, sono aggiunti ad una soluzione di 680 mg di HA-TBA sciolti in 25 ml di NMP anidro. Dopo 7 gg di reazione a temperatura ambiente, alla soluzione vengono aggiunti 20 ml di acqua bidistillata e 4 ml di soluzione satura di NaCl. Dopo 1 ora, viene aggiunto etanolo gocciolando lentamente. Il prodotto ottenuto viene recuperato per filtrazione e sciolto in acqua bidistillata, dializzato e, quando la conducibilità della soluzione di dialisi è inferiore a 10 μ S, congelato. La soluzione congelata viene, infine, liofilizzata.

Esempio 6

Preparazione di un derivato estero dell'HA con il paclitaxel con un grado di esterificazione all'ossidrile di circa il 10%

102,6 mg di paclitaxel vengono sciolti in 5 ml di dclorometano e alla soluzione sono aggiunti 20,4 mg di anidride succinica. Dopo 3 ore, il solvente viene eliminato per evaporazione tramite rotavapor. Il prodotto così ottenuto viene sciolto in 5 ml di di-metil-solfossido



Lipari
ministero Della
Sanita' e dei Servizi Sociali

(DMSO) a basso tenore d'acqua e vengono aggiunti 27,3 mg di diciclo-esil-carbodiimmide. Dopo circa 5 minuti, alla soluzione viene aggiunta una soluzione di HA-TBA, ottenuta sciogliendo 327 mg di polimero in 15 ml di DMSO a basso tenore d'acqua Il tutto viene lasciato in agitazione a temperatura ambiente per circa 24h. Successivamente, alla soluzione sono aggiunti alcuni ml di acqua e 3 ml di soluzione satura di NaCl; dopo un periodo di 1 ora si precipita mediante l'aggiunta di etanolo. Il prodotto filamentoso recuperato per filtrazione è sciolto in acqua, dializzato e, infine, liofilizzato.

Esempio 7

Preparazione di un derivato estereo dell'HA con il paclitaxel con un grado di esterificazione al carbossile di circa il 4%

A 510,1 mg di paclitaxel sciolto in 6 ml di diclorometano sono stati aggiunti 95,4 mg di acido 3-bromopropionico e 525.0 mg di EDC. Successivamente, alla soluzione è aggiunta acqua per l'eliminazione del bromuro e della carbodiimmide mediante partizionamento, mentre per l'eliminazione dei reattivi sono stati utilizzati 10 volumi d'acqua. Alla soluzione organica viene aggiunto del sodio sulfato per anidrificare e il solvente è eliminato mediante rotavapor.

155,5 mg di prodotto intermedio così ottenuto vengono aggiunti a 1,46g di HA-TBA sciolto in NMP anidro, e la soluzione così ottenuta viene mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per 7 gg. Vengono successivamente aggiunti 20 ml di acqua bidistillata e 4 ml di soluzione satura di NaCl. Il tutto viene lasciato in agitazione



[Handwritten signature]
 Fidia farmaceutici S.p.A.

per 1 ora per permettere lo scambio del sodio con lo ione TBA. Successivamente viene aggiunto etanolo goccia a goccia ed il prodotto filamentoso così ottenuto è sciolto in acqua, dializzato e, infine, liofilizzato.

Esempio 8

Preparazione dell'estere parziale autoreticolato (circa 10% di sostituzione) dell'HA con il paclitaxel

3,10 g di HA salificato TBA sono solubilizzati in 150 ml di DMSO a basso tenore d'acqua a temperatura ambiente. Alla soluzione vengono, quindi, aggiunti 541,0 mg di intermedio del paclitaxel ottenuto secondo la metodica degli esempi 3, 4 e 5. Dopo aver lasciato reagire per 7 gg a temperatura ambiente, alla soluzione di reazione vengono aggiunti 126,5 g di trietilammina e il tutto viene lasciato in agitazione per 30'.

Una soluzione di 319,5g di 2-cloro-1-metil-piridinio ioduro in 30 ml di DMSO è aggiunta lentamente goccia a goccia nell'arco di 45' e la miscela viene mantenuta a 30°C per 15 ore.

Si aggiunge, quindi, una soluzione formata da 50 ml di acqua e 1,7g di cloruro sodico e la miscela risultante viene versata lentamente in 400 ml di acetone mantenendo una continua agitazione. Si forma un precipitato che viene filtrato e lavato per 3 volte con 50 ml di acetone acqua 5:1 e per tre volte con acetone (50ml). Il prodotto finale così ottenuto è essiccato in alto vuoto a 38°C.



~~Eugenio Amministratore Delegato
della farmaceutici S.p.A.~~

Esempio 9

Prove di solubilità dell'estere HA-paclitaxel ottenuto secondo l'Esempio 5 in soluzione di glucosio al 5%

14,6 mg di prodotto HA-paclitaxel ottenuto per esterificazione secondo l'Esempio 5 (partendo da HA di peso molecolare 200 kDa) con un grado di sostituzione al carbossile del 16,3% p/p, sono stati sciolti in 1 ml di soluzione acquosa di glucosio al 5%. La soluzione, mescolata mediante agitazione magnetica, è filtrabile attraverso filtro da sterilità per siringa di 0,20 µm. La concentrazione di paclitaxel nella soluzione è di 2,38 mg/ml.

Si è, inoltre, cercato di rilevare la concentrazione massima di prodotto per ml di soluzione acquosa di glucosio al 5%: ad una concentrazione di 32,8 mg di prodotto HA-paclitaxel per ml di soluzione di glucosio, si ottiene una soluzione viscosa con una concentrazione di paclitaxel pari a 5,35 mg/ml.

Esempio 10

Prove di recupero del paclitaxel in plasma umano

Inizialmente viene preparata una soluzione costituita da 101,3 mg di HA-paclitaxel in 10 ml di acqua bidistillata. L'HA-paclitaxel utilizzato è stato preparato secondo l'Esempio 5.

La prova di recupero è condotta mettendo a contatto 40 mg della soluzione sopra descritta con 2 ml di plasma umano a 37°C.

Per la determinazione del paclitaxel che si libera in plasma staccandosi dall'HA, sono scelti 3 tempi di contatto: 6, 30 e 60 minuti. Al termine di ogni tempo di contatto, il paclitaxel come tale



[Handwritten signature]
 Amministratore Delegato
 Srl di Farmaceutici [redacted]

viene estratto dalla soluzione plasma-HA-paclitaxel con 3 lavaggi, di 1,5 ml ciascuno, di Terbutilmetiletere (TBME), poi riuniti in un unico campione, evaporati a secchezza per evaporazione naturale a 65°C, e ripresi con 400 µl di etanolo assoluto per la determinazione del suddetto farmaco con tecnica HPLC (cromatografia liquida ad alta pressione). I risultati ottenuti sono rappresentati nel grafico (Figura 2): a 6 minuti più dell'80% del paclitaxel si è staccato dall'HA e questa percentuale di rilascio non aumenta nel tempo.

Essendo l'invenzione così descritta, è chiaro che questi metodi possono essere modificati in vari modi. Tali modificazioni non sono da considerarsi come divergenze dallo spirito e dalle prospettive dell'invenzione e tutte le modifiche che apparirebbero evidenti ad un esperto nel campo sono comprese nell'ambito delle seguenti rivendicazioni.

RIVENDICAZIONI

- 1) Composti chimico-farmaceutici costituiti da acido ialuronico o un suo derivato e un componente del gruppo dei Taxani legati covalentemente attraverso i seguenti gruppi funzionali:
 - A) i gruppi ossidrilici del componente taxanico e;
 - B) i gruppi carbossilici oppure ossidrilici dell'acido ialuronico o dei suoi derivati, oppure la funzione amminica dell'acido ialuronico deacetilato;
 oppure, in alternativa, per sintesi indiretta attraverso i seguenti gruppi funzionali:



*Eugenio Sartori
Amministratore delegato
Pfizer farmaceutici S.p.A.*

- A₁) i gruppi ossidrilici del componente taxanico e;
 - B₁) i gruppi carbossilici oppure ossidrilici dell'acido ialuronico o dei suoi derivati, oppure la funzione amminica dell'acido ialuronico deacetilato e;
 - C₁) il gruppo funzionale dello spaziatore, con l'esclusione di tutte le idrazidi, che collega il componente taxanico all'acido ialuronico o ai suoi derivati.
- 2) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui il componente taxanico è il paclitaxel.
 - 3) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui l'acido ialuronico ha un peso molecolare compreso tra 400 e 3×10^6 Daltons.
 - 4) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 3 in cui l'acido ialuronico ha preferibilmente un peso molecolare compreso tra 400 e 1×10^6 Daltons.
 - 5) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 4 in cui l'acido ialuronico ha più preferibilmente un peso molecolare compreso tra 400 e 230.000 Daltons.
 - 6) Composti chimico-farmaceutici secondo le rivendicazioni 1, 3-5 in cui l'acido ialuronico è salificato con basi organiche e/o inorganiche.
 - 7) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui il derivato dell'acido ialuronico è rappresentato da esteri dell'acido ialuronico con alcoli della serie alifatica, aralifatica, cicloalifatica, aromatica, ciclica ed eterociclica,



S. Mazzoni
Pubblicato su G.R. n. 11
10.01.2002



con una percentuale di esterificazione che può variare a seconda del tipo e della lunghezza dell'alcool usato, comunque mai superiore al 50% di esterificazione.

- 8) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui il derivato dell'acido ialuronico è rappresentato da ammidi dell'acido ialuronico con ammine della serie alifatica, aralifatica, cicloalifatica, aromatica, ciclica ed eterociclica, con una percentuale di amidazione dal 0,1 al 10%.
- 9) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui il derivato dell'acido ialuronico è rappresentato da derivati O-solfatati dell'acido ialuronico fino al 4° grado di solfatazione.
- 10) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui il derivato dell'acido ialuronico è rappresentato da esteri interni dell'acido ialuronico con una percentuale di esterificazione non superiore al 10%.
- 11) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui il derivato dell'acido ialuronico è rappresentato da deacetilati dell'acido ialuronico che derivano dalla deacetilazione della frazione N-acetyl-glucosamina, con una percentuale di deacetilazione preferibilmente tra lo 0,1 e il 30%.
- 12) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui il derivato dell'acido ialuronico è rappresentato da derivati percarbossilati dell'HA ottenuti dall'ossidazione



14
15
16
17
18
19

dell'ossidrile primario della frazione N-acetil-glucosamina, con grado di percarbossilazione tra lo 0 e il 100%.

- 13) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui i gruppi funzionali dell'acido ialuronico e/o dei suoi derivati coinvolti sono i gruppi ossidrilici.
- 14) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui i gruppi funzionali dell'acido ialuronico e/o dei suoi derivati coinvolti sono i gruppi carbossilici.
- 15) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 11 in cui i gruppi funzionali dell'acido ialuronico deacetilato coinvolti sono gruppi amminici.
- 16) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui lo spaziatore tra l'acido ialuronico o i suoi derivati e il componente taxanico è costituito da una catena alifatica o aralifatica, lineare o ramificata avente gruppi ossidrilici o carbossilici, carbonilici, epossidici, cloruri acilici, tioli, nitrili, alogenici, anidridi, isocianati, isotiocianati, gruppi amminici con l'esclusione delle idrazidi.
- 17) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 16 in cui lo spaziatore è rappresentato da acidi carbossilici con un numero di atomi di carbonio da 3 a 10.
- 18) Composti chimico-farmaceutici secondo le rivendicazioni 16-17 in cui lo spaziatore è l'acido bromopropionico.
- 19) Composti chimico-farmaceutici secondo le rivendicazioni 16-17 in cui lo spaziatore è l'acido bromobutirrico.



~~DISPONIBILE
SOPRA IMMAGINE D'URG.
Finita la rassegna 10/10/2011~~

- 20) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui il legame tra lo spaziatore e il gruppo ossidrilico dell'acido ialuronico o dei suoi derivati è un legame estereo.
- 21) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui il legame tra lo spaziatore e il gruppo ossidrilico dell'acido ialuronico o dei suoi derivati è un legame uretanico.
- 22) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui il legame tra lo spaziatore e il gruppo ossidrilico dell'acido ialuronico o dei suoi derivati è un legame etereo.
- 23) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui il legame tra lo spaziatore e il gruppo ossidrilico dell'acido ialuronico o dei suoi derivati è un legame acetalico.
- 24) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui il legame tra il gruppo ossidrilico dell'acido ialuronico o dei suoi derivati e il componente taxanico è un legame acetalico.
- 25) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui il legame tra lo spaziatore e il gruppo carbossilico dell'acido ialuronico o dei suoi derivati è un legame estereo.
- 26) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui il legame tra lo spaziatore e il gruppo carbossilico dell'acido ialuronico o dei suoi derivati è un legame ammidico.



Scritto il 22/11/2017
a firma di Dello Russo
Farmaceutici S.p.a.

- 27) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui il legame tra il gruppo carbossilico dell'acido ialuronico o dei suoi derivati e il componente taxanico è un legame estereo.
- 28) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui il legame tra lo spaziatore e i gruppi amminici dell'acido ialuronico deacetilato è un legame ammidico.
- 29) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui il legame tra lo spaziatore e i gruppi amminici dell'acido ialuronico deacetilato è un legame uretanico.
- 30) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui il legame tra i gruppi amminici dell'acido ialuronico deacetilato e il componente taxanico è un legame uretanico.
- 31) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 7 in cui l'acido ialuronico viene esterificato successivamente al legame con il componente taxanico.
- 32) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 10 in cui l'acido ialuronico viene esterificato successivamente al legame con il componente taxanico.
- 33) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui il legame covalente tra il componente taxanico e lo spaziatore è un legame estereo.
- 34) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui il legame covalente tra il componente taxanico e lo spaziatore è un legame uretanico.



H. J. H.
Amministratore
Finia farmaceutici



- 35) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui il legame covalente tra il componente taxanico e lo spaziatore è un legame acetalico.
- 36) Composti chimico-farmaceutici secondo le rivendicazioni 1-2 in cui la percentuale di legame tra l'acido ialuronico e il componente taxanico è compresa tra lo 0,1 e il 50%.
- 37) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 36 in cui la percentuale di legame tra l'acido ialuronico e il componente taxanico è compresa preferibilmente tra lo 0,1 e il 20%.
- 38) Composti chimico-farmaceutici secondo le rivendicazioni 6-12 in cui l'acido ialuronico o i suoi derivati potenziano l'azione antitumorale del componente taxanico.
- 39) Composti chimico-farmaceutici secondo la rivendicazione 1 in cui l'estere interno dell'acido ialuronico potenzia l'azione antitumorale del componente taxanico.
- 40) Composizioni farmaceutiche contenenti uno dei composti chimico-farmaceutici di cui alla rivendicazione 1.
- 41) Composizioni farmaceutiche secondo la rivendicazione 40 somministrabili per via endovenosa, intramuscolare, sottocutanea, transdermica, o direttamente nel sito tumorale per iniezione diretta.
- 42) Composizioni farmaceutiche secondo la rivendicazione 41 in cui l'acido ialuronico o i suoi derivati è capace di liberare il componente taxanico nel sito di somministrazione.



- ~~Proprietà riservata~~
- 43) Composizioni farmaceutiche secondo la rivendicazione 40 somministrati per via orale.
- 44) Composizioni farmaceutiche secondo le rivendicazioni 40-43 contenenti eventualmente una o più sostanze biologicamente o farmacologicamente attive.
- 45) Composizioni farmaceutiche come dalla rivendicazione 44, contenenti una o più sostanze biologicamente o farmacologicamente attive scelte tra steroidi, ormoni, fattori trofici, proteine, vitamine, farmaci antiinfiammatori non sterioidei, chemioterapici, calcio-antagonisti, antibiotici, antivirali, interleuchine e citochine.
- 46) Composizioni farmaceutiche di cui alla rivendicazione 45 contenenti interferone.
- 47) Uso di composizioni farmaceutiche secondo le rivendicazioni 40-46 in campo oncologico.
- 48) Processo per la preparazione di composti chimico-farmaceutici mediante sintesi diretta dell'acido ialuronico o dei suoi derivati, con un componente del gruppo dei Taxani tramite legame estereo secondo le seguenti fasi:
- A) attivazione del gruppo carbossilico dell'acido ialuronico o dei suoi derivati mediante un agente attivante;
 - B) aggiunta del componente taxanico solubilizzato in solvente aprotico;
 - C) purificazione del prodotto ottenuto;





- A_i) attivazione del gruppo ossidrilico del componente taxanico mediante un agente attivante;
 - B_i) aggiunta dell'acido ialuronico o di un suo derivato solubilizzato in solvente aprotico;
 - C_i) purificazione del prodotto ottenuto;
 - A_{ii}) preparazione del bromuro o del tosilato del componente taxanico;
 - B_{ii}) sostituzione nucleofila del bromuro o del tosilato da parte del gruppo carbossilico dell'acido ialuronico o dei suoi derivati;
 - C_{ii}) purificazione del prodotto ottenuto.
- 49) Processo per la preparazione di composti chimico-farmaceutici mediante sintesi diretta dell'acido ialuronico deacetilato con un componente del gruppo dei Taxani tramite legame uretanico secondo le seguenti fasi:
- A) attivazione del gruppo ossidrilico del componente taxanico mediante agente attivante;
 - B) aggiunta dell'acido ialuronico deacetilato solubilizzato in solvente aprotico;
 - C) purificazione del prodotto ottenuto.
- 50) Processo per la preparazione di composti chimico-farmaceutici mediante sintesi diretta dell'acido ialuronico o dei suoi derivati con un componente del gruppo dei taxani tramite legame acetalico secondo le seguenti fasi:



Stile
1990

- A) preparazione di una soluzione contenente l'acido ialuronico o dei suoi derivati e il componente taxanico in solvente aprotico;
 - B) aggiunta di un composto carbonilico semplice come la formaldeide;
 - C) purificazione del prodotto ottenuto.
- 51) Processo per la preparazione di composti chimico-farmaceutici mediante sintesi indiretta tra i gruppi ossidrilici dell'acido ialuronico o dei suoi derivati e il componente taxanico tramite uno spaziatore, legato all'acido ialuronico con legame estereo secondo le seguenti fasi:
- A) attivazione della funzione carbossilica dello spaziatore che può essere eventualmente precedentemente legato al componente taxanico;
 - B) aggiunta dell'acido ialuronico o dei suoi derivati;
 - C) purificazione del prodotto ottenuto;
 - D) successiva eventuale sintesi con il componente taxanico;
- A₁) sostituzione del gruppo ossidrilico dell'acido ialuronico o dei suoi derivati con un gruppo tosilato oppure sua bromurazione;
- B₁) aggiunta dello spaziatore recante una funzione carbossilica eventualmente precedentemente legato al componente taxanico;
- C₁) purificazione del prodotto ottenuto;



- D_i) successiva eventuale sintesi del prodotto di cui al punto precedente con il componente taxanico;
- A_{ii}) aggiunta di uno spaziatore recante una funzione anidridica ad una soluzione contenente acido ialuronico o dei suoi derivati;
- B_{ii}) purificazione del prodotto ottenuto;
- C_{ii}) sintesi del prodotto di cui al punto precedente con il componente taxanico.
- 52) Processo per la preparazione di composti chimico-farmaceutici mediante sintesi indiretta tra i gruppi ossidrilici dell'acido ialuronico o dei suoi derivati e il componente taxanico tramite uno spaziatore, legato all'acido ialuronico con legame uretanico secondo le seguenti fasi:
- A) attivazione dell'ossidrile dell'acido ialuronico o dei suoi derivati mediante un agente attivante;
 - B) aggiunta dello spaziatore recante funzione amminica eventualmente precedentemente legato al componente taxanico;
 - C) purificazione del prodotto ottenuto;
 - D) successiva eventuale sintesi con il componente taxanico;
 - A_i) aggiunta di acido ialuronico o dei suoi derivati ad una soluzione contenente uno spaziatore recante funzione isocianato o isotiocianato eventualmente precedentemente legato al componente taxanico;



3/11/90
 Accordo di Cooperazione
 fra la Repubblica Italiana e
 la Repubblica Federale Tedesca

- B_i) purificazione del prodotto ottenuto;
 - C_i) successiva eventuale sintesi con il componente taxanico;
- 53) Processo per la preparazione di composti chimico-farmaceutici mediante sintesi indiretta tra i gruppi ossidrilici dell'acido ialuronico o dei suoi derivati e il componente taxanico tramite uno spaziatore, legato all'acido ialuronico con legame etero secondo le seguenti fasi:
- A) aggiunta ad una soluzione di acido ialuronico o dei suoi derivati di uno spaziatore recante funzione epossidica in presenza di catalisi acida o basica, eventualmente precedentemente legata al componente taxanico;
 - B) purificazione del prodotto ottenuto;
 - C) successiva eventuale sintesi con il componente taxanico;
 - A_i) sostituzione del gruppo ossidrilico dell'acido ialuronico o dei suoi derivati con un gruppo tosilato oppure sua bromurazione;
 - B_i) aggiunta dello spaziatore recante funzione ossidrilica in ambiente fortemente basico;
 - C_i) purificazione del prodotto ottenuto;
 - D_i) sintesi con il componente taxanico.
- 54) Processo per la preparazione di composti chimico-farmaceutici mediante sintesi indiretta tra i gruppi ossidrilici





dell'acido ialuronico o dei suoi derivati e il componente taxanico tramite uno spaziatore, legato all'acido ialuronico con legame acetalico secondo le seguenti fasi:

- A) aggiunta ad una soluzione contenente acido ialuronico o dei suoi derivati di uno spaziatore recante funzione carbonilica in ambiente acido o basico;
 - B) purificazione del prodotto ottenuto;
 - C) successiva sintesi con il componente taxanico;
 - A₁) aggiunta di un composto carbonilico semplice come la formaldeide, ad una soluzione contenente acido ialuronico o dei suoi derivati ed uno spaziatore recante funzione ossidrilica eventualmente precedentemente legato al componente taxanico;
 - B₁) purificazione prodotto ottenuto;
 - C₁) eventuale sintesi del prodotto con il componente taxanico;
- 55) Processo per la preparazione di composti chimico-farmaceutici mediante sintesi indiretta tra i gruppi carbossilici dell'acido ialuronico o dei suoi derivati e il componente taxanico tramite uno spaziatore, legato all'acido ialuronico con legame estereo secondo le seguenti fasi:
- A) aggiunta di un agente attivante ad una soluzione contenente acido ialuronico o dei suoi derivati;
 - B) alla soluzione di cui al punto precedente viene aggiunto uno spaziatore recante funzione ossidrilica



- M
- eventualmente precedentemente legato al componente taxanico;
- C) purificazione del prodotto ottenuto;
 - D) eventuale sintesi con il componente taxanico;
 - A₁) ad una soluzione di acido ialuronico o dei suoi derivati è aggiunto uno spaziatore recante un gruppo alogeno quale il bromo, eventualmente precedentemente legato al componente taxanico;
 - B₁) purificazione prodotto ottenuto;
 - C₁) eventuale sintesi del prodotto con il componente taxanico;
- 56) Processo per la preparazione di composti chimico-farmaceutici mediante sintesi indiretta tra i gruppi carbossilici dell'acido ialuronico o dei suoi derivati e il componente taxanico tramite uno spaziatore, legato all'acido ialuronico con legame ammidico secondo le seguenti fasi:
- A) aggiunta di un agente attivante ad una soluzione di acido ialuronico o dei suoi derivati;
 - B) alla soluzione di cui al punto precedente è aggiunto uno spaziatore recante funzione amminica eventualmente precedentemente legato al componente taxanico;
 - C) purificazione del prodotto ottenuto;
 - D) eventuale sintesi con il componente taxanico.
- M
-



- 57) Processo per la preparazione di composti chimico-farmaceutici mediante sintesi indiretta tra i gruppi amminici dell'acido ialuronico deacetilato e il componente taxanico tramite uno spaziatore, legato all'acido ialuronico con legame ammidico secondo le seguenti fasi:
- A) attivazione con agente attivante del gruppo carbossilico dello spaziatore dello spaziatore eventualmente precedentemente legato al componente taxanico;
 - B) aggiunta di una soluzione contenente acido ialuronico deacetilato;
 - C) purificazione del prodotto ottenuto;
 - D) eventuale sintesi con il componente taxanico.
- 58) Processo per la preparazione di composti chimico-farmaceutici mediante sintesi indiretta tra i gruppi amminici dell'acido ialuronico deacetilato e il componente taxanico tramite uno spaziatore, legato all'acido ialuronico con legame uretanico secondo le seguenti fasi:
- A) attivazione con agente attivante della funzione ossidrilica dello spaziatore eventualmente precedentemente legato al componente taxanico;
 - B) aggiunta della soluzione contenente acido ialuronico deacetilato;
 - C) purificazione del prodotto ottenuto;
 - D) sintesi eventuale con il componente taxanico.

Zambon



[Signature]
Riccardo Sartori
Bridia Biopatologia e Genetica

Curva di sopravvivenza : controllo vs. ACP

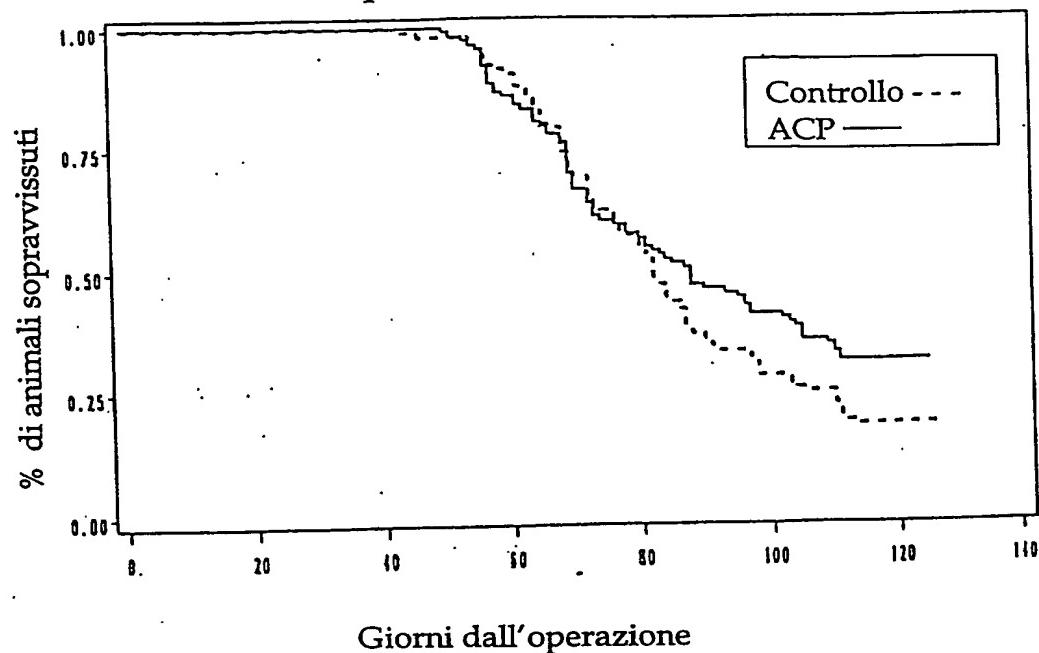


Figura 1



Ministero della Sanità
Istituto Superiore di Sanità
Roma - Italia

Prove di recupero Paclitaxel in plasma umano

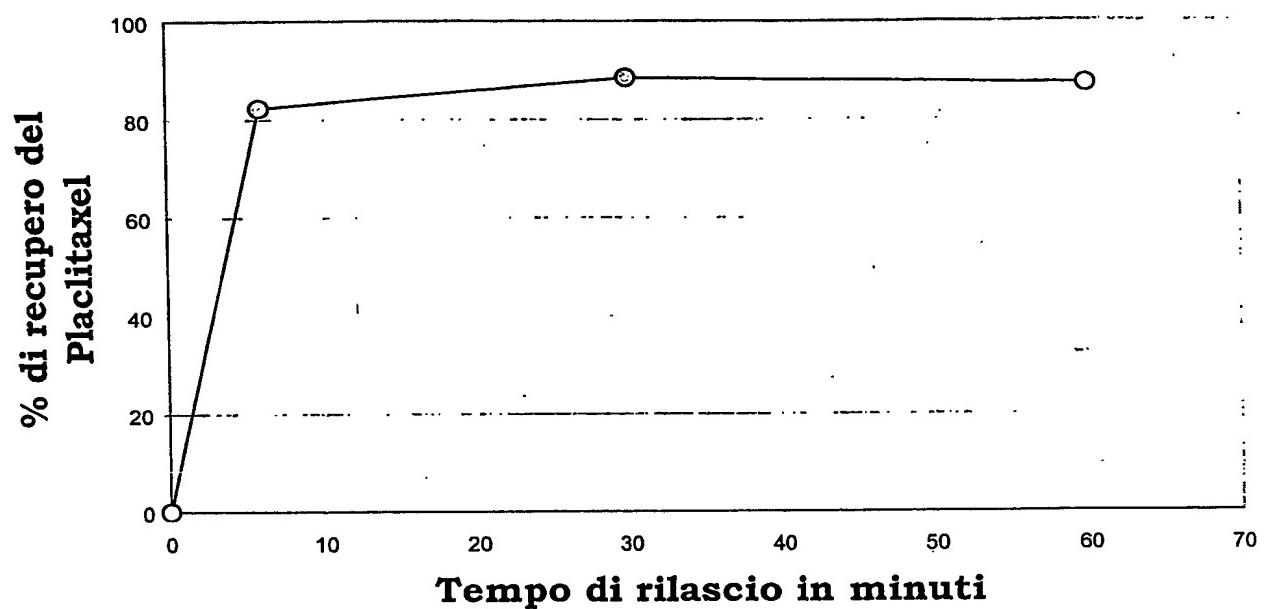


Figura 2





AI MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE

Ufficio Centrale Brevetti

Via Molise, 19

ROMA

ISTANZA DI ACCOGLIMENTO

VERSIONE DEFINITIVA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

La sottoscritta Fidia Farmaceutici S.p.A., C.F. e P.I. 00204260285, con sede legale in Via Ponte della Fabbrica, n. 3/A – 35031 Abano Terme (PD), nella persona del suo Legale Rappresentante e Amministratore Delegato, Dr. Emilio Mauri, C.F. MRA MLE 33B27 E951L, nato a Mariano Comense (CO) il 27.02.1933 e ivi residente in Via C. Battisti, 4, in seguito a domanda di brevetto per invenzione industriale presentata in via provvisoria in data 18.10.2002 con N. PD2002A000271;

CHIEDE

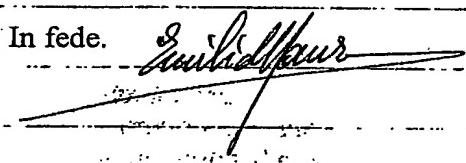
che venga accolta la domanda di brevetto allegata nella versione definitiva, facendo presente quanto segue:

- che sono stati rispettati i 60 giorni di tempo previsti per legge per il deposito della domanda di brevetto definitiva dalla data di deposito della domanda provvisoria;
- che le parti aggiunte riguardano le formule di struttura chimica che meglio rappresentano i composti chimico-farmaceutici già descritti letteralmente nella versione provvisoria della presente invenzione, ribadendo quindi che nulla di nuovo è stato riportato in descrizione o rivendicato rispetto alla versione provvisoria originaria;



- che l'aggiunta della parte grafica relativa alle formule chimiche ha
comportato uno slittamento delle pagine di descrizione + tavole disegno
da 43 a 55, con conseguente variazione delle tasse governative da
versare. A tal fine, la sottoscritta allega attestazione di pagamento
integrativa di Euro 180,76 (Euro centottanta//00), pari alla differenza tra
le tasse governative versate per la domanda di brevetto per invenzione
nella versione provvisoria (Euro 291,80 – vedi fotocopia allegata) e
quanto dovuto per legge per il deposito e le prime tre annualità di
domande di brevetto per invenzione industriale da 50 a 100 pagine pari
a Euro 472,56 (Euro quattrocentosettantadue//56).

In fede.



All. Fotocopia bollettino c.c.postale del 17.10.02 di Euro 291,80.-



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.